Aus dem
Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn

ZYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN MUTAGENEN NEBENWIRKUNG VON CHLORPROPAMID AN IN VITRO EXPONIERTEN LYMPHOZYTEN DES MENSCHEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Marianne Baumann

~~1985~~
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0066

Aus dem

Institut für Humangenetik und Anthropologie

der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn

ZYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN MUTAGENEN NEBENWIRKUNG VON CHLORPROPAMID AN IN VITRO EXPONIERTEN LYMPHOZYTEN DES MENSCHEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marianne Baumann

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent:
gez.: Priv.-Doz. Dr. Basler

Korreferent:
gez.: Frau Prof. Dr. Herberg

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
1. Sulfonylharnstoffe in der Therapie des Diabetes mellitus	1
2. Problemstellung	3
3. Kriterien bei der Wahl des Testsystems	5
4. Strukturelle Chromosomenaberrationen	8
5. Chemisch- physikalische Eigenschaften, Pharmakologie und Metabolisierung von Chlorpropamid	10
II. Material und Methode	12
1. Chemikalien	12
2. Vorbereitung des Versuchs und der Substanzen	13
2.1. Spender der Blutproben	13
2.2. Gewinnung der Blutproben	13
2.3. Vorbereitung der Kulturgefäße	14
2.4. Herstellung des S 9- Mixes	14
2.5. Herstellung der Testsubstanzlösung	15
2.6. Herstellung der Cyclophosphamidlösung für die Positivkontrolle	16
2.7. Colcemid	16
3. Versuchsansätze	16
3.1. Negativkontrolle	16
3.2. Einzelprüfung von DMSO und S 9- Mix	17
3.3. Positivkontrolle	17
3.4. Versuchsansätze mit Chlorpropamid	17
4. Versuchsaufbau	17
5. Kriterien der Auswertung und Statistik	19
III. Ergebnisse	21
IV. Diskussion	27
V. Zusammenfassung	36
VI. Literatur	37

I. Einleitung

1. Sulfonylharnstoffe in der Therapie des Diabetes mellitus

Den ersten Hinweis auf die blutzuckersenkende Wirkung von Sulfonamidderivaten gaben 1942 JANBON und Mitarbeiter (24), die bei Typhuspatienten, die mit dem Sulfonymid ITPD (p- Aminophenylsulfonamidisopropylthiodiazol) antibiotisch behandelt worden ware, zum Teil sehr schwere Hypoglykämien feststellten. Die Veröffentlichung dieser Beobachtung veranlaßte LOUBATIERES noch im selben Jahr, diese spezifische Nebenwirkung der Sulfonamide genauer zu untersuchen. Dabei stellte er bei seinen Versuchstieren ebenfalls reproduzierbare Senkungen des Blutglucosespiegels nach ITPD- Gabe fest (27).
Die therapeutische Nutzung dieses Effektes für die Behandlung des Diabetes mellitus begann aber erst im Jahre 1955, als FRANKE und FUCHS eine Arbeit über die erfolgreiche Behandlung einer großen Zahl von Diabetikern mit dem Sulfonylharnstoff BZ 55 (Carbutamid) veröffentlichten (16). Seitdem sind zahlreiche neue Präparate dieser Stoffklasse speziell für die orale Diabetestherapie entwickelt worden, von denen außer dem Carbutamid, das neben seiner blutzuckersenkenden auch noch die volle antibiotische Wirkung besitzt, vor allem Tolbutamid, Glibenclamid und Chlorpropamid klinische Bedeutung erlangten (46).
Schon in den ersten Studien über die blutzuckersenkdenden Sulfonylharnstoffe wurde jedoch deutlich, daß die therapeutische Wirkung der Substanzen an das Vorhandensein und die Funktionsfähigkeit wenigstens eines Teils der Pankreasinselzellen gebunden war. Daraus ergibt sich, daß der schwere, durch Untergang der B- Zellen des Pankreas hervorgerufene

Insulinmangeldiabetes, wie er zumeist bei juvenilen Diabetikern vorliegt, nicht in das Indikationsgebiet der Sulfonylharnstoffe fällt. Mit Sulfonylharnstoffderivaten werden heute hauptsächlich Altersdiabetiker (älter als 40 Jahre) mit relativem Insulinmangel behandelt, bei denen durch diätetische Maßnahmen allein keine ausreichende Senkung des Blutzuckerspiegels mehr zu erzielen ist, durch Stimulation der Inselzellen mit Sulfonylharnstoffen jedoch noch genügend körpereigenes Insulin freigesetzt wird. Zudem bieten sie als oral applizierbare Substanzen Vorteile bei Patienten, deren Blutzuckereinstellung mit Insulin wegen mangelhafter Kooperationsfähigkeit nicht möglich ist, sowie bei Diabetikern, die im Laufe der Therapie eine Resistenz gegen exogen zugeführtes Insulin entwickelt haben (9 ; 20).

Kontraindiziert sind Sulfonylharnstoff- Antidiabetika bei allen Formen von Diabetes, die durch absoluten Insulinmangel (Insulinbedarf größer als 40 Einheiten / Tag) charakterisiert sind, sowie bei Neigung zu ketoacidotischen Stoffwechselentgleisungen und deutlich eingeschränkter Nierenfunktion (9 ; 20).

Trotz der notwendigen Einengung des Indikationsbereiches durch die genannten Faktoren werden die Sulfonylharnstoffe ihren Stellenwert in der Diabetestherapie behalten, besonders, nachdem aus der zweiten Gruppe oraler Antidiabetika, den Biguaniden, fast alle Präparate wegen unkontrollierbarer Nebenwirkungen aus dem Handel gezogen werden mußten. Gegenwärtig werden jährlich etwa fünf Millionen Patienten mit Sulfonylharnstoffen behandelt (18).

2. Problemstellung

Mehr als 20 Jahre nach Einführung der Sulfonylharnstoffe in die Therapie, nachdem weltweit bereits eine große Anzahl von Patienten zum Teil langjährig mit diesen Stoffen behandelt worden war, beschäftigten sich 1976 erstmals WATSON und Mitarbeiter mit den möglichen cytogenetischen Auswirkungen dieser Wirkstoffgruppe. Sie untersuchten eine Patientengruppe von 23 Diabetikern, von denen 21 Patienten unterschiedlich lange (zehn Tage bis neun Jahre) mit verschiedenen Dosen des Sulfonylharnstoffes Chlorpropamid antidiabetisch behandelt worden waren. Diesen Probanden wurde eine Kontrollgruppe von 22 unbehandelten, größtenteils stoffwechselgesunden Personen gegenübergestellt, die in Bezug auf Alters- und Geschlechtsverteilung wie die Testgruppe zusammengesetzt war. Es wurden Blutlymphozytenkulturen von allen Untersuchten angefertigt und Art und Anzahl struktureller Chromosomenaberrationen in je 100 Zellen pro Testperson bestimmt. Dabei fand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Chromosomenaberrationsrate in den Lymphozyten der mit Chlorpropamid behandelten Diabetiker. Es fiel dabei insbesondere die erhöhte Anzahl dizentrischer Chromosomen und Translokationen auf, da diese Arten von Chromosomenaberrationen spontan vergleichsweise nur sehr selten auftreten.

Die Untersucher folgerten aus ihren Ergebnissen, daß der Sulfonylharnstoff Chlorpropamid möglicherweise in der Lage ist, Chromosomenaberrationen zu induzieren und damit als potentiell mutagen anzusehen ist. Sie konnten jedoch einen genetischen Effekt der diabetischen Stoffwechsellage selbst dabei nicht ausschließen.(43).

Der entscheidende Nachteil der Arbeit von WATSON et al. liegt darin,

daß es sich um eine rein retrospektive Studie mit allen daraus resultierenden Schwierigkeiten der Standardisierung handelt. So wurden die Werte für die spontane Häufigkeit von Chromosomenaberrationen beispielsweise nicht an den später mit Antidiabetika behandelten Diabetikern vor Beginn ihrer medikamentösen Therapie ermittelt, sondern an einer aus anderen Personen zusammengesetzten Kontrollgruppe. Es besteht also die Möglichkeit, daß die Diabetikergruppe schon vor Beginn der Chlorpropamid- Behandlung eine höhere Chromosomenaberrationsrate aufwies als die Kontrollgruppe, bedingt z.B. durch interindividuelle Schwankungen der Aberrationsrate oder durch andere, nicht medikamentöse erbschädigende Umwelteinflüsse. Die untersuchte Patientengruppe war darüberhinaus in Bezüg auf Dauer und Dosierung der Antidiabetikabehandlung sehr heterogen, es wurden keine Serumwirkstoffspiegel bestimmt, so daß keine Klarheit über die Konzentrationen der getesteten Substanz, die im Blut auf die Lymphocyten einwirken konnten, bestand.

Diese von WATSON et al. durchgeführte Untersuchung initiierte in den letzten Jahren mehrere Mutagenitätsprüfungen (siehe Diskussion).

Da Chlorpropamid vorwiegend an Patienten jenseits des fortpflanzungsfähigen Alters angewendet wird, dürften eventuelle mutagene Eigenschaften zwar von geringerer Bedeutung für genetisch bedingte Fehlbildungen oder die Populationsgenetik sein (35); wegen des erwiesenen Zusammenhanges zwischen Mutagenität und Kanzerogenese (1 ; 37) schien es dennoch wichtig, cytogenetische Auswirkungen des Sulfonylharnstoffes genauer zu untersuchen.

Da die bisherigen Untersuchungen zur Mutagenität von Chlorpropamid widersprüchlich sind, wurde das Problem mit der vorliegenden Arbeit erneut aufgegriffen. Hierbei erfolgte die Analyse erstmals an Lymphozyten

des Menschen, die der Testsubstanz und einem in vitro- Aktivierungssystem (S 9- Mix) exponiert worden sind.

3. Kriterien bei der Wahl des Testsystems

Eines der vordringlichsten Anliegen bei der Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität ist die möglichst gute Übertragbarkeit der im Labor gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen (42). Am ehesten erfüllt wird diese Forderung, in dem man Chromosomen von Menschen untersucht, die die zu testende Substanz über einen gewissen Zeitraum in der gewünschten Applikationsart und -dosis erhielten. Dieses Vorgehen läßt sich aber nur in den wenigsten Fällen tatsächlich verwirklichen: die absichtliche Verabfolgung potentiell mutagener Substanzen an Versuchspersonen verbietet sich von allein, so daß solche in vivo- Untersuchungen an Menschen nur retrospektiv an therapeutisch, beruflich oder zufällig (beispielsweise durch Unfall) exponierten Personen vorgenommen werden können. Diese sind jedoch wie alle retrospektiven Studien mit den erheblichen Mängeln in Standardisierung und Reproduzierbarkeit behaftet.

Als Ausweichmöglichkeit bietet sich eine in vitro- Untersuchung an menschlichen Zellen an, bei der die Versuchsbedingungen (Expositionszeit, Wirkstoffspiegel etc.) weitestmöglich konstant gehalten werden können. Lymphozyten aus dem peripheren Blut sind dabei aus folgenden Gründen vorteilhaft (15):

1) Sie sind in ausreichender Menge schnell und einfach durch Venenpunktion zu gewinnen.
2) Sie liegen im Blut größtenteils synchronisiert in der G_0 - bzw. G_1-

Phase vor und teilen sich dort nur sehr selten.

3) Ein Teil der peripheren Blutlymphozyten läßt sich mit Phytohämagglutinin unter geeigneten Kulturbedingungen zur Mitose anregen.

4) Die spontane Häufigkeit von Chromosomenaberrationen in Lymphozyten ist sehr niedrig.

Der Nachteil einer einfachen in vitro- Testung von Stoffen - gleich an welchen Zellen - liegt jedoch darin, daß hierbei mögliche Veränderungen der Substanz durch den Säugerstoffwechsel nicht mitberücksichtigt werden. So wird eine große Anzahl von Pharmaka nach der Resorption überwiegend in der Leber metabolisiert. Dabei erhalten die entstehenden Stoffwechselprodukte zum Teil völlig neue Eigenschaften. Daß gerade dies von besonderer Bedeutung für spätere mutagene Eigenschaften eines Pharmakons sein kann, zeigt sich an dem bekannten Beispiel des Alkylans Cyclophosphamid, das seine mutagene Wirkung ja erst nach Metabolisierung in der Leber entfaltet, während es in vitro ohne Verstoffwechselung keine Wirkung zeigt (13).

Einen ersten Versuch, diese Schwierigkeit durch das Miteinbeziehen eines metabolisierenden Systems bei in vitro - Untersuchungen zu überwinden, machten 1969 HAMPEL und Mitarbeiter (21). Sie setzten einem Testansatz mit Cyclophosphamid Rattenleberdünnschnitte zu. Nach dieser Vorinkubation wurde die Cyclophosphamidlösung abzentrifugiert und Lymphozytenkulturen zugesetzt. In den so behandelten Zellen fand sich eine erhöhte Rate von Chromosomenaberrationen, die, so folgerten die Autoren, durch die an den Leberdünnschnitten entstandenen mutagenen Metabolite des Cyclophosphamid verursacht waren.

AMES und Mitarbeiter entwickelten dann 1973 eine Methode, mit der die Mutagenitätsprüfung von Substanzen nach ihrer in vitro- Metabolisie-

rung routinemäßig möglich wurde, den Salmonella- Mikrosomen- Assay (AMES- Test) (1). Sie stellten aus homogenisierter Rattenleber durch Ultrazentrifugation bei 9000 g die sogenannte " S 9- Fraktion " her, in der sich vorzugsweise Lebermikrosomen anreichern. Diese Lebermikrosomen enthalten in hohen Konzentrationen mischfunktionelle Oxidasen, Enzyme, die für die Mehrzahl der Aktivierungsprozesse an Pharmaka in der Leber verantwortlich zu sein scheinen (17). Bestimmte Salmonella- His^- - Mutanten wurden auf Agarplatten gleichzeitig mit der zu testenden Substanz sowie S 9- Fraktion und einigen Kofaktoren inkubiert. Als Maß für die Mutagenität der entstandenen Metabolite wurde anschließend die Anzahl der rückmutierten His^+ - Salmonella - Kolonien bestimmt. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die teilweise sehr kurzlebigen Metabolite unmittelbar in der Nähe der exponierten Zellen entstehen und so direkt ihre mutagene Wirkung an ihnen entfalten können (17). Der AMES- Test hat jedoch den Nachteil, daß die durch den S 9- Mix (S 9- Fraktion + Kofaktoren) metabolisierte Substanz auf das Genom von Bakterien einwirkt und nicht auf Chromosomen von Säugerzellen. Somit können nur Punktmutationen erfaßt werden, nicht jedoch die in Säugerzellen entstehenden Chromosomenaberrationen wie beispielsweise Translokationen oder Interchange (17).
Daher verwendeten BIMBOES und GREIM in einer Untersuchung menschliche Lymphozyten als Target- Zellen und inkubierten sie mit Mäuseleber- S 9- Mix und dem Mutagen Dimethylnitrosamin. Sie fanden signifikant erhöhte Chromosomenaberrationsraten in den so behandelten Zellen (10).

In der vorliegenden Arbeit wird der Sulfonylharnstoff Chlorpropamid an menschlichen Lymphozyten in vitro auf Mutagenität getestet. Zur in vitro-

Metabolisierung der Substanz erfolgte die Exposition der Lymphozyten bei gleichzeitiger Zugabe eines S 9- Mixes, der aus Rattenlebern gewonnen wurde.
Zur Prüfung der Sensitivität des Testsystems, speziell der Aktivität des S 9- Mixes, wurde in diesem Versuch für die Positivkontrolle das Alkylans Cyclophosphamid gewählt, dessen stark mutagene Eigenschaften schon aus zahlreichen früheren Untersuchungen bekannt sind (28 ; 38). Analysiert wurden nach 72- stündiger Kultur der Lymphozyten strukturelle Chromosomenaberrationen.

4. Strukturelle Chromosomenaberrationen

Grundsätzlich sind zwei Gruppen struktureller Chromosomenaberrationen zu unterscheiden:
1) Chromatid- Typ- Aberrationen
2) Chromosomen- Typ- Aberrationen.
Welche der beiden Aberrationstypen durch ein mutagenes Agens hervorgerufen wird, hängt davon ab, in welcher Phase des Zellzyklus die Substanz mutagen wirksam ist.
Chromosomen- Typ- Aberrationen entstehen, wenn eine Schädigung in der präreplikativen Periode (G_0- oder G_1- Phase des Zellzyklus) wirksam wird, da die Chromosomen zu dieser Zeit funktionell einsträngig, d.h. noch nicht als zwei Schwesterchromatiden vorliegen. Läsionen werden in der S- Phase mitrepliziert und erscheinen in der Metaphase an beiden Chromatiden.
Es resultieren Chromosomenbrüche und -deletionen mit paarigen Fragmen-

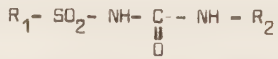
ten, dizentrische Chromosomen, Ringchromosomen und Chromosomeninversionen.

Chromatid- Typ- Aberrationen werden durch Mutagene hervorgerufen, die hauptsächlich während oder nach der Replikation, also in der S- bzw. G_2-Phase des Zellzyklus wirksam werden, da die Chromosomen nun funktionell zweisträngig als zwei nur durch das Zentromer verbundene Schwesterchromatiden vorliegen. Bei Schädigung an einer der beiden Chromatiden kommt es zu Chromatidbrüchen, eventuell zu Deletionen mit unpaaren Fragmenten oder zu Interchangen (nach Austausch von Chromatidstücken zwischen zwei oder mehreren Chromosomen).

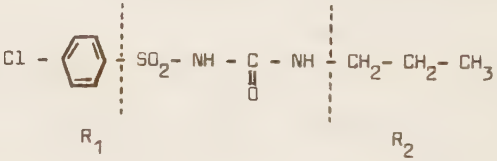
Unter Umständen kann man so anhand der in der Metaphase hauptsächlich gefundenen Chromosomenaberrationsart Hinweise auf den Zeitpunkt im Zellzyklus gewinnen, an dem die mutagene Substanz wirksam wurde (18 ; 34).

5. Chemisch- physikalische Eigenschaften, Pharmakologie und Metabolisierung von Chlorpropamid

Chlorpropamid ist einer der Abkömmlinge der Sulfonylharnstoffgruppe, denen folgende chemische Grundstruktur gemeinsam ist (2) :



Bei Chlorpropamid sind die Reste R_1 und R_2 wie folgt substituiert:



Chlorpropamid ≙1- (4- Chlorbenzolsulfonyl) - 3- propylharnstoff

Die Substanz ist farb- und geruchlos, so gut wie nicht wasserlöslich und schmilzt zwischen 126 und 128 ^{o}C (22). Chlorpropamid wird rasch enteral resorbiert: die maximale Serumkonzentration wird nach oraler Applikation bereits nach 3 bis 4 Stunden erreicht, nach 24 Stunden ist die Konzentration auf ca. 60 % des Serumspitzenwertes abgefallen. Im Blut wird das Pharmakon zum Teil an Serumalbumin gebunden. Die Ausscheidung erfolgt in einer schnellen und einer langsamen Fraktion mit einer mittleren Halbwertszeit von 35 Stunden fast ausschließlich über die Nieren (99 %). Nur 1 % der Substanz wird über Galle und Faeces eliminiert (25).

Wegen seiner ausgesprochen langen Halbwertszeit neigt Chlorpropamid stärker als andere Sulfonylharnstoffe (z.B. Tolbutamid oder Glibenclamid) zur Kumulation.

Für den Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe, also auch des Chlorpropamid, wurden bisher zum einen die Stimulation der B- Zellen der Pankreasinseln zur Ausschüttung von präformiertem Insulin, zum anderen eine Steigerung der Ansprechbarkeit des Inselapparates auf den physiologischen Glucosestimulus verantwortlich gemacht (2 ; 9 ; 12 ; 46).
Neuere Untersuchungen sprechen jedoch dafür, daß Sulfonylharnstoffe die Verfügbarkeit von Insulin- Rezeptoren an der Zelloberfläche erhöhen (32).

Während JOHNSON und Mitarbeiter (25) keine Verstoffwechselung von Chlorpropamid beim Menschen nachweisen konnten, stellten WELLES, ROOT und ANDERSSON (44) bei einer vergleichenden Untersuchung an Hunden, Kaninchen und dem Menschen chromatographisch im Urin für diese Säuger verschiedene Metabolite in geringen Konzentrationen fest. Im menschlichen Urin fanden sie nur das Stoffwechselprodukt p- Chlorobenzensulfonamid, schlossen aber das Vorkommen weiterer Metabolite, deren chromatographische Darstellung unter Umständen durch Überlagerung anderer Urinbestandteile erschwert sein könnte, oder die möglicherweise so kurzlebig sind, daß sie im Urin nicht mehr erscheinen, nicht aus.
Der größte Teil des Pharmakons wird jedoch unverändert über die Niere ausgeschieden.

II. Material und Methode

1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien einschließlich der Testsubstanz und ihre Bezugsquellen gibt Tabelle 1 wieder.

Tab. 1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen

-Äthanol absolut	Merck
- Colcemid	Seromed
- Diabetoral^{R} 1 Tabl. ≙ 250 mg Chlorpropamid	Boehringer
- DMSO = Dimethylsulfoxid	Merck
- Eisessig	Merck
- Endoxan^{R} 1 Amp. ≙ 100 mg Cyclophosphamid	Asta
- Eukitt^{R}- Kunstharz	Kindler
- Giemsa- Stammlösung (= Azur- Eosin- Methylenblau)	Merck
- Glucose- 6 - phosphat	Boehringer
- Kaliumchlorid	Merck
- Liquemin^{R}	Hoffmann- La Roche
- Magnesiumchlorid	Merck
- NADP (=Nicotinamid- Adenin- dinucleotidphosphat)	Boehringer
- Phenobarbital	Merck
- Phosphatpuffer	Merck

Als Kulturmedium für die Lymphozyten wurde ein Fertigmedium (Chromosomenmedium 8, Seromed) verwendet.

2. Vorbereitung des Versuchs und der Substanzen

2.1. Spender der Blutproben

Die im Versuch verwendeten Blutproben zur Gewinnung der Lymphozyten stammten von zwei 20 bis 30 Jahre alten, gesunden Spenderinnen. Um exogene Störfaktoren so gering wie möglich zu halten, mußten die Spenderinnen folgende Bedingungen erfüllen (15) :

- keinerlei Medikamenteneinnahme vor oder während des gesamten Versuches
- keine Bestrahlung zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken
- kein Kontakt mit toxischen Substanzen wie organischen Lösungsmitteln oder Insektiziden
- keine aktive Immunisierung während des Versuches
- keine klinisch feststellbare Virusinfektion.

2.2. Gewinnung der Blutproben

In einer 5 ml - Plastikeinwegspritze mit 0,1 ml Heparin (Liquemin^{R}, Hoffmann - La Roche) wurden durch periphere Venenpunktion (V. cubitalis) 3 ml Vollblut gewonnen und durch vorsichtiges Hin- und Herkippen der Spritze mit dem Antikoagulans gut vermischt. Die Spritze wurde mit einer frischen Kanüle versehen, mit einer Plastikkappe verschlossen und anschließend bei Zimmertemperatur in einen Ständer gestellt, so daß die geformten Blutbestandteile sedimentieren konnten. Die Lymphozyten finden sich danach zum größten Teil wegen ihrer im Vergleich zu Erythrocyten geringeren Dichte im Plasmaüberstand und in der Grenzschicht zu den Erythrozyten.

2.3. Vorbereitung der Kulturgefäße

Das für den gesamten Versuch verwendete, komplette Lymphozytenkulturmedium (Chromosomenmedium B, Fa. Seromed) stand in 100 ml - Flaschen zur Verfügung, die bei - 20 °C gelagert wurden. Die jeweils benötigte Menge Medium wurde erst kurz vor dem Versuch aufgetaut und unter einer Sterilbank in Portionen zu je 10 ml in 50 ml- Plastikeinwegfläschchen mit Schraubverschluß abgefüllt. Vor Einbringen der Lymphozyten wurden die Portionsfläschchen mit dem Kulturmedium im Brutschrank auf 37 °C erwärmt.

2.4. Herstellung des S 9- Mix

S 9- Fraktion: Zur Leberenzyminduktion erhielten drei männliche Laborratten eine Woche lang täglich frisches Trinkwasser, dem 0,1 % Phenobarbital zugesetzt wurde. Die Tiere wurden dann durch Genickbruch getötet, die Lebern sorgfältig herauspräpariert und sofort in sterile, eiskalte 0,15 molare KCl- Lösung gebracht. Die weitere Verarbeitung erfolgte anhand der von AMES und Mitarbeitern beschriebenen Methode (1). Die so erhaltene S 9- Fraktion wurde in Portionen zu je 2 ml in sterile verschließbare Plastikröhrchen abgefüllt und bei - 70 °C tiefgefroren. Sie ist bei dieser Lagerung für mindestens drei Monate ohne nennenswerte Abnahme der Enzymaktivitäten haltbar (1). Die Sterilität der S 9- Fraktion wurde durch Ausstreichen einer kleinen Menge auf Agarplatten und anschließendes Bebrüten bei 37 °C für 48 Stunden geprüft. Die für eine Versuchsreihe jeweils benötigte Menge S 9- Fraktion wurde erst kurz vor dem Verbrauch aufgetaut und sofort weiterverarbeitet. Dabei anfallende Restmengen wurden verworfen.

S 9- Mix: In einen 10 ml- Glasbehälter wurden folgende Substanzen ein-

gewogen:

$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	16,27 mg
Glucose- 6- phosphat	15,21 mg
NADP	31,50 mg

Dazu werden pipettiert:

5 ml Phosphatpuffer pH 7,4

4 ml Aqua dest.

Die so erhaltene Lösung wurde unter einer Sterilbank mit Hilfe eines Bakterienfilters (maximale Durchlässigkeit 0,45 um, Millex^R) in ein steriles Zentrifugenröhrchen filtriert. Anschließend wurde mit einer Tuberkulinspritze 1 ml der S 9- Fraktion zugegeben und alles gut vermischt. 1,67 ml des so hergestellten S 9- Mixes wurden pro Kultur zugegeben.

2.5. Herstellung der Testsubstanzlösung

Eine 250 mg- Tablette eines handelsüblichen Chlorpropamid- Präparates (Diabetoral^R, Boehringer) wurde in einem Mörser sorgfältig pulverisiert, anschließend in ein Schüttelgefäß überführt und mit 4 ml des Lösungsmittels DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck) mit Hilfe von zwei Stahlkugeln auf einem elektrischen Rüttler für 5 bis 10 Min. gründlich suspendiert. Von der Testlösung (6,25 mg Chlorpropamid / ml) wurden zu den Kulturen gegeben:

0,13 ml zu den Kulturen ohne S 9- Mix (11 ml Gesamtvolumen)

0,15 ml zu den Kulturen mit S 9- Mix (12,67 ml Gesamtvolumen)

entsprechend 750 ug Chlorpropamid / ml Kulturflüssigkeit $\triangleq 2{,}7 \times 10^{-3}$ molar.

Diese Dosis entspricht etwa dem Hundertfachen der niedrigsten therapeutisch wirksamen Serumkonzentration (7 - 10 mg / 100 ml) und dem Drei-

8igfachen des maximal erreichbaren Serumspiegels (20 mg / 100 ml) von oral appliziertem Chlorpropamid (23).

2.6. Herstellung der Cyclophosphamidlösung für die Positivkontrolle

100 mg Cyclophosphamid (Endoxan^{R}, Asta) wurden mit 5 ml Aqua dest. gelöst und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf 200 ml aufgefüllt. Davon wurden

0,3 ml zu den Kulturen ohne S 9- Mix (Gesamtvolumen 11,0 ml)

und

0, 35 ml zu den Kulturen mit S 9- Mix (Gesamtvolumen 12,67 ml)

gegaben, was jeweils einer Kulturendkonzentration von 6 x 10^{-5} molar entsprach.

2.7. Colcemid

Zur Mitosehemmung wurden pro 10 ml Kultur jeweils 0,4 ml einer gebrauchsfertigen Colcemidlösung (10 ug / ml, Fa. Seromed) zugesetzt, entsprechend einer Kulturendkonzentration von 0,4 ug / ml.

3. Versuchsansätze

3.1. Negativkontrolle

Zur Ermittlung der spontanen Häufigkeit von Chromosomenaberrationen wurden von den Blutproben der Spender 72- Stunden Lymphozytenkulturen ohne Zusatz anderer Substanzen und ohne den Waschvorgang nach 50 Stunden durchgeführt. Alle anderen Versuchsbedingungen entsprachen denjenigen der übrigen Kulturen.

3.2. Einzelprüfung von DMSO und S 9- Mix

Um mögliche mutagene Wirkungen der zusätzlich zur Testsubstanz eingebrachten Substanzen auszuschließen, wurden zwei Ansätze nur mit dem Lösungsmittel DMSO, zwei weitere Ansätze nur mit S 9- Mix und zum Ausschluß einer gegenseitigen Beeinflussung drei Ansätze mit DMSO + S 9- Mix angefertigt.

3.3. Positivkontrolle

Zur Prüfung der Sensitivität des Testsystems wurden fünf Ansätze mit S 9- Mix + Cyclophosphamid, das ja erst nach Verstoffwechselung seine mutagene Wirkung erhält, als Positivkontrolle angesetzt.
Gleichzeitig wurde ein Ansatz mit Cyclophosphamid ohne Zusatz des metabolisierenden Systems inkubiert.

3.4. Versuchsansätze mit Chlorpropamid

Insgesamt 9 Versuchsansätze mit Chlorpropamid wurden angefertigt:

3 Ansätze mit Chlorpropamid ($2{,}7 \times 10^{-3}$ molar) + S 9- Mix
5 Ansätze mit Chlorpropamid ($2{,}7 \times 10^{-3}$ molar) ohne S 9- Mix
1 Ansatz mit Chlorpropamid ($5{,}4 \times 10^{-3}$ molar) ohne S 9- Mix.

4. Versuchsaufbau

0 h: Einbringen der Lymphocyten ins Kulturmedium
Die Kanüle der Spritze mit dem sedimentierten Blut wurde umgeknickt und der Serumüberstand sowie die ersten Tropfen der Erythrocytengrenzschicht in das Kulturgefäß überführt, danach für 48 h bei 37 ^{o}C im Brut-

schrank kultiviert.

48 h: Einbringen der Testsubstanzen

Der Inhalt der Kulturfläschchen wurde sorgfältig aufgeschüttelt. Mit einer Tuberkulinspritze wurden die jeweils benötigten Substanzen (Cyclophosphamid, Chlorpropamid gelöst in DMSO, S 9- Mix) unter der Sterilbank eingebracht und anschließend 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

50 h: Waschen der Lymphozyten

Durch vorsichtiges Hin- und Herkippen der Kulturfläschchen wurde der Inhalt sorgfältig resuspendiert, anschließend in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Tischzentrifuge 5 Min. zentrifugiert (die ersten 3 Min. bei 900 UpM, dann 2 Min. bei 1100 UpM). Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 5 ml frischem, 37 °C warmen Nährmedium resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert.

Dieser Waschvorgang wurde 2 x wiederholt.

Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Pellet mit 2 ml frischem Medium resuspendiert, danach in eine neue Kulturflasche mit 8 ml frischem, vorgewärmten Medium gegeben und für weitere 24 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

69 h: Drei Stunden vor der Aufarbeitung wurde den Kulturen zur Mitosehemmung Colcemid (0,4 ug/ ml Kulturflüssigkeit) zugesetzt.

72 h: Aufarbeitung

Der Inhalt des Kulturfläschchens wurde unter Vermeidung von Schaumbildung vorsichtig resuspendiert, in Zentrifugenröhrchen überführt, 5 Min. bei 1500 UpM zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde zur hypotonen Behandlung mit 6 ml 37 °C warmer 0,075 molarer (≙0,56 %iger) KCl- Lösung resuspendiert und 7 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen, danach wieder 5 Min. bei 1500 UpM zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit einigen Tropfen eiskaltem Fixativ (Äthanol + Eisessig = 3 + 1) gemischt, dann wurden 6 ml Fixativ zupipettiert und für 20 bis 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment nochmals mit 6 ml Fixativ gemischt, sofort wieder zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Das Sediment wurde aufgeklopft, die Suspension mit einigen Tropfen Fixativ verdünnt und auf fettfreie, eiskalte Objektträger aufgetropft. Danach wurden die Präparate an der Luft getrocknet, in 8 ml Giemsa- Stammlösung + 192 ml Phosphatpuffer pH 6,8 5 Min. lang gefärbt und zweimal in Leitungswasser gespült.

Nach völliger Lufttrocknung wurden die gefärbten Präparate mit Eukitt^{R}- Kunstharz eingedeckelt. Sie konnten nach Härtung der Masse ein bis zwei Tage später mikroskopiert werden.

5. Kriterien der Auswertung und Statistik

Die Präparate wurden bei 400- facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop mäanderförmig durchgemuster, brauchbare Mitosen bei 1000- facher Vergrößerung mit Ölimmersion beurteilt. Die Auswertung erfolgte in Anlehnung an die von EVANS und O' RIORDAN geforderten Bedingungen (15):

1) Berücksichtigt wurden nur kontrastreich angefärbte Metaphasen ohne Chromosomenüberlagerungen, die unter Umständen Aberrationen verdekken könnten.
2) Außer bei der Positivkontrolle wurden nur komplette Mitosen (d.h. solche mit 46 Chromosomen) beurteilt. Bei den Präparaten der Positivkontrolle wurden Mitosen mit 46 $\pm$ 1 Chromosomen ausgewertet.

3) Die Chromosomen sollten ausreichen spiralisiert, also nicht zu lang sein, die Schwesterchromatiden gut abgrenzbar, aber noch nicht wie in der frühen C- Anaphase völlig voneinander getrennt sein, da dies die Auswertung und Zählung sehr erschwert.
4) Es wurden nur Präparate mit relativ hohem Mitose- Index ausgewertet, da diese erfahrungsgemäß auch qualitativ bessere Metaphasen aufweisen.
5) Pro Kulturansatz wurden mindestens 100 Metaphasen ausgewertet, vorhandene Chromosomenaberrationen mit Noniusangabe (Möglichkeit der späteren Kontrolle) notiert.
6) Bei schwierig zu beurteilenden Grenzfällen (bspw. Frage: Gap oder Bruch?) wurde ein zweiter Beobachter zur Entscheidung hinzugezogen.
7) Wegen der noch nicht völlig geklärten Bedeutung achromatischer Läsionen wurden Gaps in dieser Untersuchung bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Analysiert wurden somit:

a) Brüche und Fragmente
b) Deletionen
c) Exchanges

Traten in einer Zelle 2 bis 4 Aberrationen auf, so wurde bei der Zusammenstellung nur eine aufgeführt, und zwar die jeweils schwerste Aberration der Metaphase. Traten $\geq$ 5 Aberrationen pro Zelle auf, so wurde sie gesondert aufgelistet und zwar als Zelle mit multiplen Aberrationen.

Die Signifikanzprüfung der ermittelten Ergebnisse erfolgte im X^2 - Test bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

III. Ergebnisse

Die Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen bei den 600 analysierten Metaphasen der Negativkontrolle lag mit 1,3 % im Bereich der in der Literatur gefundenen Werte (3 ; 10 ; 41 ; 43).
Die drei Kontrollserien, in denen zum Ausschluß möglicher Nebeneffekte die zusätzlich zur Testsubstanz verwendeten Stoffe (S 9- Mix, DMSO, S 9- Mix + DMSO) getestet wurden, wiesen mit 1,8 % , 2,6 % bzw. 2,0 % Zellen mit Aberrationen keine signifikante Erhöhung auf.
Cyclophosphamid ohne Zusatz des metabolsierenden Systems induzierte nur 1 Aberration / 100 ausgewertete Metaphasen. Der Prozentsatz an Aberrationen liegt somit erwartungsgemäß im Bereich der für die Negativkontrolle ermittelten Werte.
In den 500 beurteilten Metaphasen der mit Cyclophosphamid + S 9- Mix behandelten Positivkontrolle hingegen fand sich eine deutlich signifikante Erhöhung an Chromosomenaberrationen : von 100 ausgewerteten Mitosen wiesen 72 Aberrationen auf. In 24 von 100 Zellen fanden sich sogar Interchange oder multiple Aberrationen ($\hat{=} \geqslant 5$ Aberrationen / Zelle).
In weiteren Versuchen wurde Chlorpropamid ohne Zusatz von S 9- Mix getestet. In den insgesamt 5 Ansätzen mit einer Chlorpropamid- Konzentration von 750 ug / ml fand sich keine signifikante Erhöhung der Chromosomenaberrationsrate. In einem weiteren Testansatz wurde die eingesetzte Chlorpropamid- Konzentration verdoppelt. Auch in diesen Kulturen traten keinerlei mutagene Effekte auf.
In sämtlichen Kulturen mit Chlorpropamid + S 9- Mix fand sich keine signifikante Erhöhung von Chromosomenaberrationen.

Eine Übersicht über die bei den verschiedenen Testansätzen erhaltenen Werte gibt Tabelle 2. In Tabelle 3 sind die gefundenen Chromosomenaberrationen nach Art und Häufigkeit für die einzelnen Testserien zusammengestellt.

Die Abbildung 1 zeigt eine vollständige und intakte Metaphase aus einer 72- Stunden- Lymphocytenkultur.

Abbildung 2 stellt einen Ausschnitt aus einer Metaphase mit einem Chromatidbruch (B', siehe Pfeil) dar.

Die Metaphase in Abbildung 3 weist einen Isobruch (B'', siehe Pfeil) auf.

Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt aus einer Metaphase mit multiplen Aberrationen inklusive Interchangen.

Tab. 2: In vitro induzierte strukturelle Chromosomenaberrationen (ausgen. Gaps) in menschl. Lymphozyten

Testserie	Zahl d. Blutproben[x]	Zahl d. ausgewerteten Metaphasen	Metaphasen mit Chromosomenaberr.		Metaphasen m. Exchangen und/ oder m. A.	
			Zahl	%	Zahl	%
a) Negativkontrolle	3	600	8	1,3	0	0
b) S 9- Mix (Ratte)	3	500	13	2,6	0	0
c) DMSO	2	500	9	1,8	1	0,2
d) DMSO + S 9- Mix (Ratte)	3	500	10	2,0	1	0,2
e) 6×10^{-5} M Cyclophosphamid ohne S 9- Mix	1	200	2	1,0	0	0
f) 6×10^{-5} M Cyclophosphamid + S 9- Mix	5	500	360	72,0*	127	25,4
g) $2,7 \times 10^{-3}$ M Chlorpropamid + DMSO, ohne S 9- Mix	5	830	12	1,4	0	0
h) $5,4 \times 10^{-3}$ M Chlorpropamid + DMSO, ohne S 9- Mix	1	200	2	1,0	0	0
i) $2,7 \times 10^{-3}$ M Chlorpropamid + DMSO + S 9- Mix	3	500	13	2,6	1	0,2

*= signifikant erhöht bei $p < 0,05$

m.A. = multiple Aberrationen ($\geq$ 5 Aberrationen / Zelle)

x 4 Kulturen pro Blutentnahme

Tab. 3: Art und Häufigkeit der gefundenen Chromosomenaberrationen

Testserie	Zahl d. ausgewerteten Metaphasen	Zahl der Metaphasen mit: B + F	D	E	m. A.	Summe
a) Negativkontrolle	600	8	-	-	-	8
b) S 9- Mix (Ratte)	500	13	-	-	-	13
c) DMSO	500	8	-	-	1	9
d) DMSO + S 9- Mix (Ratte)	500	9	-	-	1	10
e) 6×10^{-5} M Cyclophosphamid ohne S 9- Mix	200	2	-	-	-	2
f) 6×10^{-5} M Cyclophosphamid + S 9- Mix	500	211	22	38	89	360
g) $2,7 \times 10^{-3}$ M Chlorpropamid + DMSO, ohne S 9- Mix	830	12	-	-	-	12
h) $5,4 \times 10^{-3}$ M Chlorpropamid + DMSO, ohne S 9- Mix	200	2	-	-	-	2
i) $2,7 \times 10^{-3}$ M Chlorpropamid + DMSO + S 9- Mix	500	11	1	1	-	13

B = Brüche, F = Fragmente, D = Deletioenen, E = Exchange, m. A. = multiple Aberrationen

Abb. 1

Abb. 2

Abb. 3

Abb. 4

IV. Diskussion

In ihrer 1976 veröffentlichten Arbeit über die cytogenetischen Auswirkungen von Sulfonylharnstoffen beim Menschen stellten WATSON et al. in den Lymphozyten von Diabetikern, die lange Zeit mit dem Sulfonylharnstoff Chlorpropamid therapiert worden waren, erhöhte Chromosomenaberrationsraten fest (43). Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren jedoch nur mit Einschränkungen zu interpretieren, da es sich, wie schon erwähnt, um eine retrospektive Studie mit Mängeln in Standardisierung und Reproduzierbarkeit handelt. Zudem wurde eine mögliche Beeinflussung des genetischen Materials durch die diabetische Stoffwechsellage dabei nicht geklärt (siehe Problemstellung).

Die Arbeit von WATSON und Mitarbeitern wurde somit zum Ausgangspunkt für weitere Mutagenitätsprüfungen mit dem Sulfonylharnstoff Chlorpropamid. Dabei lieferten Untersuchungen mit dem Salmonella- Mikrosomen- Assay (RENNER und MÜNZNER 1980, BASLER und RÖHRBORN 1981) sämtlich negative Ergebnisse und somit keinerlei Hinweise auf etwaige Mutagenität der Substanz.

Im Chromosomenaberrationstest, bei dem kleinen Säugern Chlorpropamid mittels einer Schlundsonde verabreicht wurde und anschließend Knochenmarkszellen der so behandelten Tiere auf strukturelle Chromosomenaberrationen untersucht wurden, fand sich keine Erhöhung der Aberrationsrate (33). Selbst bei Zufuhr von Chlorpropamid in bis zu 1000- facher therapeutischer Humandosis zeigte sich keine Zunahme struktureller Chromosomenaberrationen (BASLER und RÖHRBORN, unpubliziert).

Der als weitere screening- Methode durchgeführte Mikronucleus- Test an Ratten, Hamstern und Mäusen erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. Während er bei Ratten und chinesischen Hamstern negativ ausfiel, war die Anzahl der Mikrokerne in Knochenmarkszellen von Mäusen aus drei verschiedenen Stämmen erhöht (33). Dieses Resultat steht jedoch in gewissem Widerspruch zu dem des von denselben Autoren durchgeführten Chromosomenaberrationstests. Mikrokerne werden bekanntlich im wesentlichen aus Bruchstücken von Chromosomen gebildet. Chromosomenbrüche und daraus hervorgehende Fragmente sind aber beim Chromosomenaberrationstest nicht in erhöhter Anzahl gefunden worden. Somit sind die Ergebnisse des Mikronukleus-Tests nicht eindeutig zu bewerten.

Übereinstimmende Resultate erbrachten demgegenüber Mutagenitätsprüfungen von Chlorpropamid mit der SCE- Methode (SCE ≙ Sister Chromatid Exchange). Durch unterschiedliche Anfärbung der Chromatiden eines Chromosoms können bei diesem Verfahren Austausche von DNA- Stücken zwischen den beiden Schwesterchromatiden sichtbar gemacht werden.

BROWN und WU untersuchten mit der SCE- Methode die Wirkung von Chlorpropamid auf die SCE- Rate in vitro an V 79- Zellen des chinesischen Hamsters. Sie fanden eine signifikante dosisabhängige Zunahme der SCE- Frequenz nach 24- stündiger Inkubation der Zellkulturen mit dem Sulfonylharnstoff (14).

BASLER und RÖHRBORN stellten in einer vergleichenden Untersuchung von sechs der gebräuchlichsten oralen Antidiabetika in Knochenmarkszellen chinesischer Hamster, denen Chlorpropamid oral verabreicht worden war, ebenfalls eine signifikant höhere SCE- Rate fest. Sie konnten darüberhinaus auch einen mutagenen Effekt der diabetischen Stoffwechsellage selbst durch Untersuchungen an Knochenmarkszellen diabetischer und nichtdiabeti-

scher Mäuse mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen (6).
Die übereinstimmend positiven Ergebnisse mit der SCE- Methode bei negativen Resultaten mit dem Salmonella- Mikrosomen- Assay und dem Chromosomenaberrationstest legen die Vermutung nahe, daß mit dem SCE- Test aufgrund höherer Empfindlichkeit Wirkungen schwacher Mutagene möglicherweise eher nachzuweisen sind als mit anderen Verfahren zur Mutagenitätstestung.
Dies wurde von anderen Autoren schon zuvor postuliert (11 ; 31 ; 39) .
Jedoch stellt sich die Frage, welche Bedeutung einer so schwachen Mutagenität zukommt, die mit anderen Testmethoden nicht nachweisbar ist. In den beiden genannten Untersuchungen mit Chlorpropamid war die SCE- Rate zwar signifikant erhöht, jedoch kam es nicht zu einer Verdoppelung der Rate im Vergleich zur Kontrolle. Im gleichen Bereich lag beispielsweise die Erhöhung der SCE- Frequenz bei einer Untersuchung von Coffein, das ja nicht als Mutagen, sondern nur als Komutagen angesehen wird (5).
Zudem ist der genaue Mechanismus der Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen bislang noch nicht hinreichend geklärt. Möglicherweise spielt bei der Induktion von SCE's nicht nur die Mutagenität, sondern auch die Toxizität einer Substanz eine Rolle (11).
Aus einer leichten Erhöhung der SCE- Häufigkeit kann somit nicht unbedingt auf eine mutagene Wirkung einer Substanz geschlossen werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei den vorausgegangenen Mutagenitätsprüfungen mit Chlorpropamid waren der Anlaß für die vorliegende Arbeit, bei der der Sulfonylharnstoff an menschlichen Lymphozyten in vitro mit und ohne Zusatz eines metabolisierenden Systems auf Mutagenität getestet wurde.

Ein Vergleich der Ergebnisse für die Negativkontrolle mit Werten aus der Literatur gestaltete sich schwierig, da in jeder Untersuchung Lymphozytenkulturen zu anderen Bedingungen vorgenommen wurden. So variierten beispielsweise die Zusammensetzung der Nährmedien, das Volumenverhältnis Blut / Kulturflüssigkeit, die Dauer der Kultur. In einigen Arbeiten wurden die Lymphozyten im Vollblut in die Kulturen eingebracht, in anderen wurde nur das lymphozytenreiche Plasma verwendet. Möglicherweise bedingen diese variablen Parameter die Streuung der Werte für die Spontanrate struktureller Chromosomenaberrationen bei in vitro- kultivierten Lymphozyten von 0,5 bis 5 % (3 ; 10 ; 41 ; 43). Die in dieser Untersuchung ermittelte Rate von 1,3 % liegt damit im unteren Bereich der in der Literatur angegebenen Werte, was sich jedoch durch die oben erwähnten Unterschiede in den Kulturbedingungen sowie durch eventuelle leichte interindividuelle Schwankungen der Spontanaberrationsrate in den Lymphozyten verschiedener Spender erklären läßt.

In den beiden Kontrollserien mit DMSO sowie mit DMSO + S 9- Mix fanden sich, verglichen mit den Werten für die Negativkontrolle bzw. der Serie, der ausschließlich S 9- Mix zugesetzt worden war, keine signifikant höheren Aberrationsraten. Damit ergaben sich keinerlei Hinweise auf mutagene Eigenschaften dieser Substanzen.

Dise Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von STAIGER (41), der selbst nach Zusatz von 2 % DMSO zu Lymphozytenkulturen keine signifikante Erhöhung der Aberrationsrate fand. Die von ihm beobachtete Abnahme des Mitose- Index nach Zugabe von DMSO machte sich in geringerem Maße auch hier bemerkbar. In Präparaten von mit DMSO behandelten Kulturen war die Anzahl der Mitosen erniedrigt, was jedoch die Auswertung in keiner Weise beeinträchtigte.

In vivo ist für viele Substanzen der Stoffwechsel, besonders in der Leber, von großer Bedeutung. Um diese in vivo Verhältnisse in vitro so genau wie möglich nachzuahmen, wurde einer Testserie gleichzeitig mit Chlorpropamid als in vitro- metabolisierendes System eine Rattenleber- Mikrosomenfraktion (S 9- Mix) zugesetzt. Zum Nachweis der Aktivität des S 9- Mixes wurde die Positivkontrolle mit dem Alkylans Cyclophosphamid, das seine mutagenen Eigenschaften erst nach Metabolisierung in der Leber erhält, durchgeführt.

Um auszuschließen, daß eine Aktivität des S 9- Mix durch Effekte von unverstoffwechseltem Cyclophosphamid in der Positivkontrolle nur vorgetäuscht werden könnte, wurde eine Kultur nur mit dem Alkylans ohne metabolisierendes System inkubiert. Erwartungsgemäß zeigte sich keinerlei Einfluß der nicht verstoffwechselten Substanz auf die Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen. Auch andere Autoren beobachteten keinen Effekt bei alleinigem Zusatz von Cyclophosphamid zu Lymphozytenkulturen (29). Die starke Erhöhung an Aberrationen bei der Positivkontrolle ist also allein auf die Wirkung der durch S 9- Mix- Verstoffwechselung entstandenen Cyclophosphamid- Metabolite zurückzuführen, was die Aktivität des S 9- Mix unter Beweis stellt.

Bei den in der Positivkontrolle gefundenen Aberrationen handelt es sich hauptsächlich um Chromatid- und Isochromatidbrüche und unpaare Fragmente (in 211 von 360 Zellen mit Aberrationen die schwerste Aberration), gefolgt von Interchangen (in 38 Zellen) und Deletionen (in 22 Zellen). In 89 von 500 ausgewerteten Metaphasen fanden sich multiple Aberrationen. Cyclophosphamid induzierte also fast ausschließlich Chromatidtyp- Aberrationen, was darauf hinweist, daß es seine Wirkung hauptsächlich intra- und postreplikativ entfaltet.

Auffällig ist, daß in einer Untersuchung von MADLE und OBE (29) die Chromosomenaberrationsraten in Lymphozyten nach Behandlung mit in vitro-metabolisiertem Cyclophosphamid selbst bei Zusatz erhablich höherer Dosen wesentlich niedriger liegen. Wahrscheinlich läßt sich dies durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen erklären. Bei MADLE und OBE wurde das Alkylans vor dem Einbringen in die Lymphozytenkulturen für eine Stunde mit dem S 9- Mix präinkubiert. Dadurch werden möglicherweise kurzlebige, reaktive Metabolite der Substanz später in der Kultur nicht mehr wirksam. Zudem wurden Cyclophosphamid und S 9- Mix den Kulturen nicht direkt zugesetzt, sondern in einer Dialyse- Tasche, die die Toxizität des Gemisches mindern sollte. Dies könnte jedoch gleichzeitig einen ausreichenden Kontakt der Lymphozyten mit den cytogenetisch aktiven Metaboliten der Substanz zu einem gewissen Grad beeinträchtigt haben.

Für die Testansätze mit Chlorpropamid wurde das Pharmakon den Lymphozytenkulturen in einer Konzentration von 750 ug/ ml ($2{,}7 \times 10^{-3}$ molar) zugesetzt. Dies entspricht der höchsten von BROWN und WU in ihrer in vitro-Untersuchung eingesetzten Chlorpropamiddosis (14). Gemessen am niedrigsten therapeutisch wirksamen Serumspiegel (7 - 10 mg/ 100 ml) bzw. der maximal erreichbaren Serumkonzentration (20 mg/ 100 ml) von oral appliziertem Chlorpropamid beim Menschen lag die Konzentration in den Lymphozytenkulturen beim ca. 30- bzw. 100- fachen dieser Wirkstoffspiegel (23).

In einer Testserie wurde den Lymphozytenkulturen simultan mit Chlorpropamid zusätzlich Rattenleber- S 9- Mix, dessen Aktivität durch die gleichzeitig angesetzte Positivkontrolle nachgewiesen wurde, zugesetzt, um mögliche Effekte durch in vitro entstehende Metabolite des Sulfonylharnstoffes mitzuerfassen. Die Chromosomenaberrationsraten der so behandelten

Lymphozyten waren sämtlich nicht signifikant erhöht. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß in diesem Testansatz durch das verstoffwechselnde System aus Chlorpropamid keine oder zumindest nicht in ausreichender Menge Metabolite entstanden, die in der Lage waren, Aberrationen zu induzieren. FRANTZ und MALLING (17) wiesen jedoch im Zusammenhang mit der Problematik der in vitro- Metabolisierung von Stoffen auf verschiedene Parameter hin, die bei der Interpretation der Ergebnisse dieses Testansatzes zu berücksichtigen sind. So können manche Stoffwechselreaktionen, die in vivo ablaufen, trotz Metabolisierung durch Leberenzyme in vitro fehlen. Ist der genaue Metabolismus einer zu testenden Substanz unbekannt, so fehlen möglicherweise in der Kultur zur Verstoffwechselung notwendige Kofaktoren. Je nachdem, ob die Ausgangssubstanz nun durch Metabolisierung erst mutagen wird oder ob es dadurch zu einer Inaktivierung kommt, kann es zu falsch positiven oder aber falsch negativen Ergebnissen kommen. Möglicherweise können auch Konjugationsreaktionen (Glucuronidierung und Sulfatierung), die in vivo in der Leber Substanzen chemisch verändern, in der Kultur wegen Mangels an Kofaktoren nicht ablaufen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist zudem dadurch begrenzt, daß unter Umständen eine bei der Ratte im Vergleich zum Menschen unterschiedliche Leberenzymausstattung andere Stoffwechselprodukte hervorbringen könnte. Da in der Literatur Angaben über den Metabolismus von Chlorpropamid bei der Ratte fehlen, kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden.

Von der Testserie mit Chlorpropamid ohne Zusatz von S 9- Mix wurden insgesamt 6 verschiedene Testansätze angefertigt. In den 5 Testansätzen, denen Chlorpropamid in einer Konzentration von $2,7 \times 10^{-3}$ molar zugesetzt wurde, fand sich keine Erhöhung der Chromosomenaberrationsrate. Auch in einem Testansatz mit der doppelten Dosis Chlorpropamid ($5,4 \times 10^{-3}$ molar) blieb die Rate struktureller Chromosomenaberrationen im Normbereich.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß in den beiden Testserien mit Chlorpropamid sowohl mit als auch ohne in vitro- metabolisierendem System eine Mutagenität der Substanz nicht nachzuweisen war.

Bei der Bewertung dieses Ergebnisses ist jedoch zu berücksichtigen, daß Chlorpropamid hier nur auf seine Fähigkeit hin geprüft wurde, nach akuter Einwirkung Chromosomenaberrationen zu induzieren, während chronische Auswirkungen wegen der begrenzten Kulturdauer nicht mitberücksichtigt werden konnten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Art der Application (akut in einer großen Einzeldosis oder chronisch in mehreren kleinen Dosen) einen Einfluß auf die cytogenetischen Auswirkungen einer Substanz haben kann, wie eine Arbeit von SRAM zeigt (40).

Faßt man die bisher vorliegenden Befunde cytogenetischer Untersuchungen mit Chlorpropamid zusammen, so ergibt sich folgendes Bild (Tab. 4) :

Tab. 4 : Prüfung von Chlorpropamid auf Mutagenität

Befund	Testsystem	Untersucher
-	Salmonella-Lebermikrosomen-test	RENNER und MÜNZNER (33) BASLER und RÖHRBORN (6)
-	Lymphozyten in vitro ohne S 9-Mix	
-	Lymphozyten in vitro mit S 9- Mix	
(+)	Lymphozyten in vivo	WATSON (43)
-	Chromosomenaberrationstest beim Säuger	RENNER und MÜNZNER (33) BASLER und RÖHRBORN, unpubl.
+	Mikronucleus- Test beim Säuger	RENNER und MÜNZNER (33)
+	SCE in vitro	BROWN und WU (14)
+	SCE in vivo	BASLER und RÖHRBORN (6)

Auf die fragwürdigen positiven Befunde im Mikrokerntest wurde bereits eingegangen, ebenso auf die Unzulänglichkeiten der retrospektiven cytogenetischen Studie an Lymphozyten therapierter Probanden. Des weiteren wurden Zweifel an der Aussagekraft von SCE' s erhoben. Bei kritischer Bewertung der vorliegenden Daten kann also nicht auf eine mutagene Wirkung der Substanz geschlossen werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stützen sogar noch die bisherigen negativen Befunde. Obwohl also ein mögliches mutagenes Risiko für den Menschen äußerst gering zu sein scheint, wäre zur endgültigen Klärung eine klinische prospektive Studie an zu therapierenden Diabetikern wünschenswert.

V. Zusammenfassung

Bisher vorliegende Mutagenitätsuntersuchungen mit dem oralen Antidiabetikum Chlorpropamid sind widersprüchlich. Daher schienen weitere Mutagenitätsprüfungen mit dieser Substanz angebracht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche klastogene Wirkung des Sulfonylharnstoffes an 72- Stunden- Lymphozytenkulturen in vitro untersucht. Hierzu wurden die Lymphozytenkulturen mit einer Dosis Chlorpropamid, die dem 100- fachen des niedrigsten therapeutisch wirksamen Serumspiegels beim Menschen entsprach, für 2 Stunden inkubiert. 72 Stunden nach Kultivierungsbeginn wurden die Zellen zytologisch aufgearbeitet und auf strukturelle Chromosomanaberrationen hin untersucht. Da die Testsubstanz möglicherweise erst nach Verstoffwechselung mutagen wirkt, wurde in einer Versuchsserie zusätzlich zu Chlorpropamid ein in vitro-metabolisierendes System (Rattenleber- S 9- Mix nach AMES) den Lymphozytenkulturen zugesetzt.

Es fanden sich weder in den Testansätzen ohne verstoffwechselndes System noch in den Ansätzen mit S 9- Mix signifikant erhöhte Chromosomenaberrationsraten und damit keine Hinweise auf Mutagenität der Substanz.

Das als Positivkontrollsubstanz verwendete Alkylans Cyclophosphamid hingegen erwies sich in diesem Testsystem als hochmutagen, was die Aktivität des S 9- Mixes und die Sensitivität des verwendeten Testsystems unter Beweis stellte.

Die unterschiedlichen Befunde der bisher vorliegenden Mutagenitätsuntersuchungen mit Chlorpropamid werden diskutiert und gewertet.

VI. Literatur

1. AMES, B.N. ; W.E. DURSTON ; E. YAMSAKI ; F.D. LEE:
Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 70, Nr. 8, 2281 - 2285 (1973)

2. AUMÜLLER, W. ; R. HEERDT:
Sulfonylharnstoffe und verwandte Verbindungen als blutzuckersenkende Substanzen
aus: MASKE, H. (Ed.): Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXIX. Oral wirksame Antidiabetika
Springer, Berlin, 1- 105 (1971)

3. AYMÉ, S. ; J.F. MATTEI ; Y. AURRAN ; F. GIRAUD:
Non random distribution of chromosome breaks in vultured lymphocytes of normal subjects
Humangenetik,31, 161 - 175 (1976)

4. BÄNDER, A.:
Zur Pharmakologie und Toxikologie der blutzuckersenkenden Sulfonamide
aus: MASKE, H. (Ed.): Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXIX. Oral wirksame Antidiabetika
Springer, Berlin, 317 - 372 (1971)

5. BASLER, A. ; U. BACHMANN ; G. ROSZINSKY- KÖCHER ; G. RÖHRBORN:
Effects of caffeine on sister- chromatid exchanges (SCE) in vivo
Mut. Res. 59, 209- 214, (1979)

6. BASLER, A. ; G. RÖHRBORN:
Mutagenecity of oral hypoglycaemic agents
Exp. Path. 19, 49 - 52 (1981)

7. BAYER, U. ; T. BAUKNECHT:
The dose dependence of sister chromatid exchanges induced by 3 hydrocarbons, in the in vivo bone marrow test with chinese hamsters
Experientia 33, 25 (1977)

8. BENDER, M.A. ; J.G. BREWEN:
Factors influencing chromosome aberration yields in the human peripheral leukocyte system
Mut. Res. 8, 383 - 399 (1969)

9. BERGER, W.:
Die Behandlung des Diabetes mellitus mit peroralen Antidiabetika
Ther. Umsch. 24, 318 - 326 (1967)

10. BIMBOES, D. ; H. GREIM :
Human lymphocytes as target cells in a metabolizing test system in vitro for detecting potential mutagens
Mut. Res. 35, 155 - 160 (1976)

11. BRADLEY, M.O. ; J.C. HSU ; C.C. HARRIS:
Relationship between sister chromatid exchange and mutagenecity, toxicology and DNA- damage
Nature 282, 318 - 320 (1979)

12. BRETSCHNEIDER, H.:
Oral antidiabetics
aus: DUBACH, M.C. ; A. BÜCKERT (Hrsg.):
Recent hypoglycemic sulfonylureas
Huber, Bern, 22 - 32 (1971)

13. BROCK, N. ; H.J. HOHORST:
Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro
Drug. Res. 13, 1021 - 1031 (1963)

14. BROWN, R.F. ; Y. WU:
Induction of sister chromatid exchanges in chinese hamster cells by chlorpropamide
Mut. Res. 56, 215 - 217 (1977)

15. EVANS, H.J. ; M.L. O' RIORDAN:
Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests
Mut. Res 31, 135 - 148 (1975)

16. FRANKE, H. ; J. FUCHS:
Ein neues antidiabetisches Prinzip
Dtsch. med. Wochenschr. 80, 1452 - 1454 (1955)

17. FRANTZ, C.N. ; H.V. MALLING:
The quantitative microsomal mutagenesis assay method
Mut. Res. 31, 365 - 380 (1975)

18. GEBHARDT, E.:
Chemische Mutagenese
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1977)

20. HALLER, H. ; S.E. STRAUZENBERG:
Orale Diabetestherapie
Edition Leipzig, 2. Aufl. (1966)

21. HAMPEL, K.E. ; M. FRITZSCHE ; D. STOPIK:
Quantitative Untersuchungen über Chromosomenmutationen bei menschlichen Leukocyten durch Cyclophosphamid nach Aktivierung an Leberschnitten
Humangenetik 7, 28 - 37 (1969)

22. HÄUSSLER,.A. ; F. PECHTOLD:
Die Analytik der Sulfonylharnstoffe

23. HÄUSSLER, A. ; H. WICHA:
Zum Stoffwechsel der Sulfonylharnstoffe
beide aus: MASKE, H. (Ed.): Handbuch der experimentellen Pharmakologie
XXIX. Oral wirksame Antidiabetika
Springer, Berlin, 251 - 287 und 291 - 313 (1971)

24. JANBON, N. et al.:
Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamidothiodiazol
Montpellier méd. 85, 441 (1942)

25. JOHNSON, P.C. ; A.R. HENNES ; T. DRISCOLL ; K.M. WEST:
Metabolic fate of chlorpropamide in man
Ann. N.Y. Acad. Sci. 74, 459 - 470 (1959)

26. KUSCHINSKI, G. ; H. LÜLLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
2. Aufl., Thieme Stuttgart, 272 - 275 (1978)

27. LOUBATIERES, A. et al.:
Etude experimentale chez le chien des accidents nerveux irréversibles consécutifs à l'hypoglycémie prolonguée par le sulfaisopropylthiodiazol
Comm. 43 Congr. med. aliénistes et neurologistes de France et des pays de langue Francais, Montpellier, Ed. Masson, S. 415 (1942)

28. LOVELESS, A.:
Genetic and allied effects of alkylating agents
Butterworths, London (1966)

29. MADLE, S. ; G. OBE:
In vitro testing of an indirect mutagen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultures:
Activation with liver microsomes and use of a dialysis bag
Mut. Res. 56, 101 - 104 (1977)

30. MADLE, S. ; G. OBE:
In vitro testing of an indirect mutagen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultures.
Activation by a non- enzymatic hydroxilation system (Udenfriend system)
Mut. Res. 49, 149 - 151 (1978)

31. PERRY, P. ; H.J. EVANS:
Cytological detection of mutagen- carcinogen exposure by sister chromatid exchange
Nature 258, 121 - 125 (1975)

32. PRINCE, M.J. ; J.M. OLEFSKY:
Direct in vitro effect of a sulfonylurea to increase human fibroblast insulin receptors
J. Clin. Invest. 66, 608- 611 (1980)

33. RENNER, H.W. ; R. MÜNZNER:
Mutagenecity of sulfonylureas
Mut. Res. 77, 349 - 355 (1980)

34. RIEGER, R. ; A. MICHAELIS:
Chromosomenmutationen
Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)

35. RÖHRBORN, G.:
Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen
Humangenetik 1, 205 - 231 (1965)

36. RÖHRBORN, G.:
Biochemical mechanisms of mutation
aus: VOGEL, F. ; G. RÖHRBORN (Hrsg.):
Chemical mutagenesis in mammals and man
Springer, Heidelberg, 1 - 15 (1970)

37. RÖHRBORN, G.:
Correlation between mutagenesis and carcinogenesis
Transplacental Carcinogenesis 168 - 174 (1973)

38. RÖHRBORN, G. ; A. BASLER:
Cytogenetic investigations of mammals
Comparison of the genetic activity of cytostatics in mammals
Arch. Toxicol. 38, 35 - 43 (1977)

39. ROSZINSKY - KÖCHER , G. ; G. RÖHRBORN:
Effects of various cyclophosphamide concentrations in vivo on sister chromatid exchanges (SCE) and chromosome aberrations of chinese hamster bone marrow cells
Humangenetik 46, 51 - 55 (1979)

40. SRAM, R.J. :
Relations between acute and chronic exposures in mutagenecity studies in mice
Mut. Res. 41, 25 - 42 (1976)

41. STAIGER, G.R.:
Studies on the chromosomes of human lymphocytes treated with diazepam in vitro
Mut. Res 10, 635 - 644 (1970)

42. VOGEL, F. ; G. RÖHRBORN ; I. HAUSMANN:
Die Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität
Arzneim. Forsch. 24, Nr. 10, 1665 - 1677 (1974)

43. WATSON, W.A.F. ; J.C. PETRIE ; D.B. GALLOWAY ; I. BULLOCK ; J.C. GILBERT:
In vivo cytogenetic activity of sulfonylurea drugs in man
Mut. Res. 38, 71 - 80 (1976)

44. WELLES, J.S. ; M.A. ROOT ; R.C. ANDERSSON :
Urinary metabolites of chlorpropamide in dogs, rabbits and man
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 101, 668 (1959)

45. WOLFF, S. ; A.V. CARRANO:
Report of the workshop on the utility of sister chromatid exchange
Mut. Res. 64, 53 - 56 (1979)

46. ZÖLLNER, N ; H. DÖRFLER ; W. GRÖßNER ; F. SPRENGEL ; U. SPRANDEL ; I. WALTER ; G. WOLFRAM:
Pharmakotherapie von Stoffwechselkrankheiten
aus: FORTH, W. ; D. HENTSCHLER ; W. RUMMEL: Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie
Bibliograph. Inst. Wissenschaftsverlag, Mannh., 2. Aufl. 300- 303 (1977)

Lebenslauf

22. 2. 1958	Geboren in Kapellen / Geldern als Tochter der Eheleute Theo und Gertrud Baumann
1964 - 1967	Besuch der katholischen Volksschule in Kapellen / Geldern
1967 - 1976	Besuch des Mädchengymnasiums des Kreises Kleve in Geldern
Juni 1976	Reifeprüfung
Okt. 1976	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
März 1979	Ablegen der ärztlichen Vorprüfung
März 1980	Ablegen des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
März 1982	Ablegen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Priv.-Doz. Dr. Armin Basler für die freundliche Überlassung des Themas sowie für zahlreiche wertvolle Anregungen und seine stete Gesprächsbereitschaft.

Des weiteren möchte ich ganz herzlich auch Frau Diplombiologin Inge Theiß und den medizin-technischen Assistentinnen des zytogenetischen Labors für ihre ausgesprochen freundliche und tatkräftige Unterstützung danken.

FOTODRUCK J. MAINZ — Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen